

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2000-239272

(43)Date of publication of application : 05.09.2000

(51)Int.Cl. C07D405/10
G01N 21/78
G01N 31/00
G01N 33/483
// C07F 3/00

(21)Application number : 11-040325

(71)Applicant : NAGANO TETSUO
DAI ICHI SEIYAKU CO LTD

(22)Date of filing : 18.02.1999

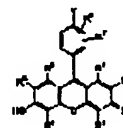
(72)Inventor : NAGANO TETSUO
HIRANO TOMOYA

(54) FLUORESCENT PROBE FOR ZINC

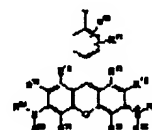
(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject new compound capable of specifically capturing zinc ion, forming a complex generating a strong fluorescent light by an exciting light in a long wave length range, and useful as a highly sensitive zinc probe.

SOLUTION: The compounds are expressed by formula I or II [R1 to R6 are each H, a halogen, cyano or a lower alkyl; R7, R8 are each H, a halogen or the like; R11 to R16 are each H, a halogen, cyano or a lower alkyl; R17, R18 are each H a halogen or the like; R21 to R24 are each H or a lower alkyl; Y is a group of formula III [(Z1, Z2 are each O, S, N(R51) (R51 is H, lower alkyl or the like) or the like; (m), (n), (p) are each 2, 3), a group of the formula: N(R31)(R32) [R31, R32 are each the formula: (CH₂)_nN(R41)(R42) or the like] or the like], e.g.; a compound of formula IV. The compound of the formula I, e.g. in the case of the compound of formula IV, is obtained by performing various reactions by using N-phenyldiethanolamine and a compound of formula V as starting materials. By using the above compound, it is possible to measure zinc ion concentration in a living body in a high sensitivity without generating cytotoxicity.



I



II



III



IV



V

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision
of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-239272

(P2000-239272A)

(43) 公開日 平成12年9月5日 (2000.9.5)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード (参考)
C 0 7 D 405/10		C 0 7 D 405/10	2 G 0 4 2
G 0 1 N 21/78		G 0 1 N 21/78	C 2 G 0 4 5
31/00		31/00	T 2 G 0 5 4
33/483		33/483	C 4 C 0 6 3
// C 0 7 F 3/00		C 0 7 F 3/00	Z 4 H 0 4 8
		審査請求 未請求 請求項の数 8	OL (全 14 頁)

(21) 出願番号 特願平11-40325

(22) 出願日 平成11年2月18日 (1999.2.18)

(71) 出願人 595108044

長野 哲雄

東京都杉並区天沼1-28-15

(71) 出願人 000002831

第一製薬株式会社

東京都中央区日本橋3丁目14番10号

(72) 発明者 長野 哲雄

東京都杉並区天沼1-28-15

(72) 発明者 平野 智也

東京都練馬区向山3-18-3 高橋荘南A

棟102号室

(74) 代理人 100096219

弁理士 今村 正純 (外2名)

最終頁に続く

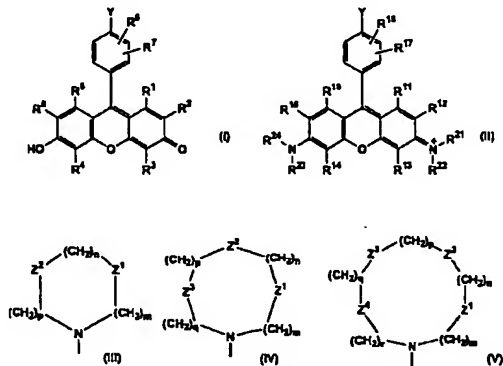
(54) 【発明の名称】 亜鉛蛍光プローブ

(57) 【要約】

【課題】 生細胞や生組織中の亜鉛イオンを生理条件下で高感度に測定するための亜鉛蛍光プローブを提供する。

【解決手段】 式 (I) 又は (II) : $[R^1 \sim R^6, R^{11} \sim R^{16}]$ は水素原子、ハロゲン原子、又は低級アルキル基等を示し; R^7, R^8, R^{17}, R^{18} は水素原子、ハロゲン原子、又は低級アルキル基を示し; $R^{11} \sim R^{16}$ は水素原子又は低級アルキル基を示し; Y は式 (III) ~ (V) $[Z^1, Z^2, Z^3, \text{及び } Z^4 \text{ は } -N(R^{11})-$ 等を示し、 R^{11} は水素原子又は低級アルキル基等を示し、 $m \sim r$ は 2 又は 3 を示す] で表される基等を示す] で表される化合物又はその塩、及び該化合物又はその塩を含む亜鉛蛍光プローブ。

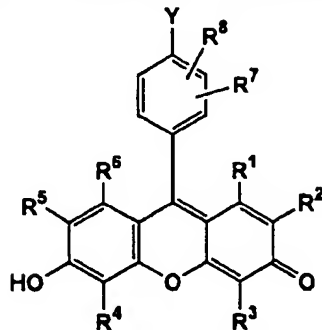
【化1】



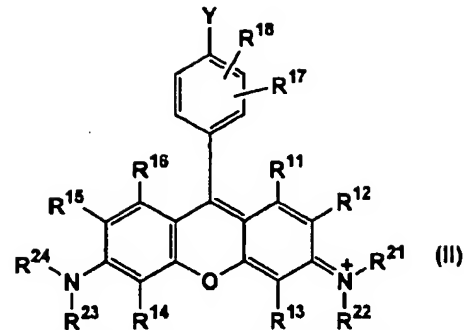
【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記の一般式 (I) 又は (II) :

* 【化1】



(I)

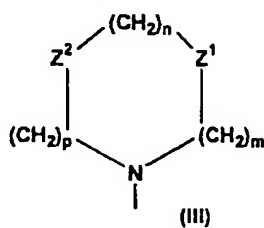


(II)

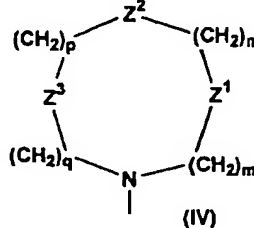
【式 (I) 中、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、及び R^6 はそれぞれ独立に水素原子、ハロゲン原子、シアノ基、又は低級アルキル基を示し； R^7 及び R^8 はそれぞれ独立に水素原子、ハロゲン原子、又は低級アルキル基を示し；式 (II) 中、 R^{11} 、 R^{12} 、 R^{13} 、 R^{14} 、 R^{15} 、及び R^{16} はそれぞれ独立に水素原子、ハロゲン原子、シアノ基、又※

※は低級アルキル基を示し； R^{17} 及び R^{18} はそれぞれ独立に水素原子、ハロゲン原子、又は低級アルキル基を示し； R^{19} 、 R^{20} 、 R^{21} 、及び R^{22} はそれぞれ独立に水素原子又は低級アルキル基を示し；式 (I) 及び式 (II) 中、Yは下記の式 (III) ないし (V) :

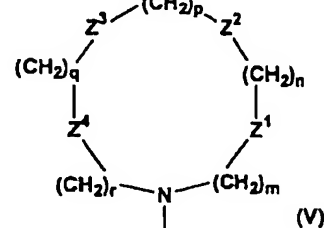
【化2】



(III)



(IV)



(V)

【式中、 Z^1 、 Z^2 、 Z^3 、及び Z^4 はそれぞれ独立に $-N(R^{11})-$ 、 $-O-$ 、又は $-S-$ を示すが、 Z^1 、 Z^2 、 Z^3 、及び Z^4 のうちの少なくとも1つは $-N(R^{11})-$ を示し、 R^{11} は水素原子、低級アルキル基、1若しくは2個以上のアミノ基で置換された低級アルキル基（該アミノ基は低級アルキル基、低級アルキルスルホニル基、又はアリールスルホニル基で置換されていてもよい）、★

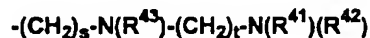
★又は1若しくは2個以上の水酸基で置換された低級アルキル基を示し；m、n、p、q、及びrはそれぞれ独立に2又は3の整数を示す】で表される基を示すか、又は式 (VI) :

【式中、 R^{11} 及び R^{12} はそれぞれ独立に下記の式 (VII) ないし (X) :

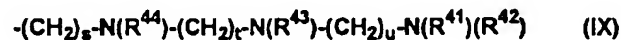
【化3】



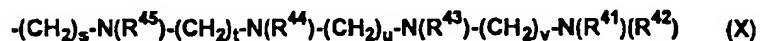
(VII)



(VIII)



(IX)



(X)

【式中、 R^{11} 、 R^{12} 、 R^{13} 、 R^{14} 、及び R^{15} はそれぞれ独立に水素原子、低級アルキル基、1若しくは2個以上のアミノ基で置換された低級アルキル基（該アミノ基は低級アルキル基、低級アルキルスルホニル基、又はアリ

ールスルホニル基で置換されていてもよい）、又は1若しくは2個以上の水酸基で置換された低級アルキル基を示し；s、t、u、及びvはそれぞれ独立に2又は3の整数を示す】で表される基及び水素原子からなる群から

置換基を示すが、 R^{11} 及び R^{12} が同時に水素原子を示すことはない]で表される基を示す]で表される化合物又はその塩。

【請求項2】 R^1 、 R^2 、 R^3 、及び R^4 が水素原子であり、 R^1 及び R^2 がそれぞれ独立に水素原子又はハロゲン原子であり、 R^3 及び R^4 が水素原子であり、Yが上記式(IV)〔式中、 Z^1 、 Z^2 、及び Z^3 がそれぞれ独立に $-N(R^{11})-$ (R^{11} は低級アルキル基を示す)であり、m、n、p、及びqが2である〕で表される基である請求項1に記載の式(I)で表される化合物又はその塩。

【請求項3】 R^1 及び R^2 がともに水素原子であるか、又はともにハロゲン原子であり、Yが上記式(IV)〔式中、 Z^1 、 Z^2 、及び Z^3 が共に $-N(CH_3)-$ である〕である請求項2に記載の化合物又はその塩。

【請求項4】 R^{11} 、 R^{12} 、 R^{13} 、及び R^{14} が水素原子であり、 R^{11} 及び R^{12} がそれぞれ独立に水素原子又はハロゲン原子であり、 R^{13} 及び R^{14} が水素原子であり、 R^{11} 、 R^{12} 、 R^{13} 、及び R^{14} が水素原子であり、Yが上記式(IV)〔式中、 Z^1 、 Z^2 、及び Z^3 がそれぞれ独立に $-N(R^{11})-$ (R^{11} は低級アルキル基を示す)であり、m、n、p、及びqが2である〕で表される基である請求項1に記載の式(II)で表される化合物又はその塩。

【請求項5】 R^{11} 及び R^{12} がともに水素原子であるか、又はともにハロゲン原子であり、Yが上記式(IV)〔式中、 Z^1 、 Z^2 、及び Z^3 が共に $-N(CH_3)-$ である〕である請求項4に記載の化合物又はその塩。

【請求項6】 請求項1ないし5のいずれか1項に記載の化合物又はその塩を含む亜鉛蛍光プローブ。

【請求項7】 請求項1ないし5のいずれか1項に記載の化合物又はその塩と亜鉛イオンとにより形成された亜鉛錯体。

【請求項8】 亜鉛イオンの測定方法であって、下記の工程：

(a)請求項1ないし5のいずれか1項に記載の化合物又はその塩と亜鉛イオンとを反応させる工程；及び
(b)上記工程(a)で生成した請求項7に記載の亜鉛錯体の蛍光強度を測定する工程を含む方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、亜鉛イオンを特異的に捕捉して蛍光を発する亜鉛蛍光プローブに関するものである。

【0002】

【従来の技術】亜鉛はヒトの体内において鉄に次いで含量の多い必須金属元素であり、細胞内のほとんどの亜鉛イオンは蛋白質と強固に結合して、蛋白質の構造保持や機能発現に関与している。また、細胞内にごく微量存在するフリーの亜鉛イオン（通常は μM レベル以下である）の生理的役割についても、種々の報告がある。特に、細胞死の一つであるアポトーシスには亜鉛イオンが深く関わっていると考えられており、アルツハイマー病の老人斑の形成を促進しているなどの報告もある。

【0003】従来、組織内の亜鉛イオンを測定するために、亜鉛イオンを特異的に捕捉して錯体を形成し、錯体形成に伴って蛍光を発する化合物（亜鉛蛍光プローブ）が用いられている。亜鉛蛍光プローブとして、例えば、TSQ (Reyes, J.G., et al., Biol. Res., 27, 49, 1994)、Zinquin ethyl ester (Tsuda, M. et al., Neurosci., 17, 6678, 1997)、Dansylaminoethylcyclen (Koike, T. et al., J. Am. Chem. Soc., 118, 12686, 1996)、Newport Green (Molecular Probe社のカタログである"Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals" 6th Edition by Richard P. Haugland pp.531-540)などが実用化されている。

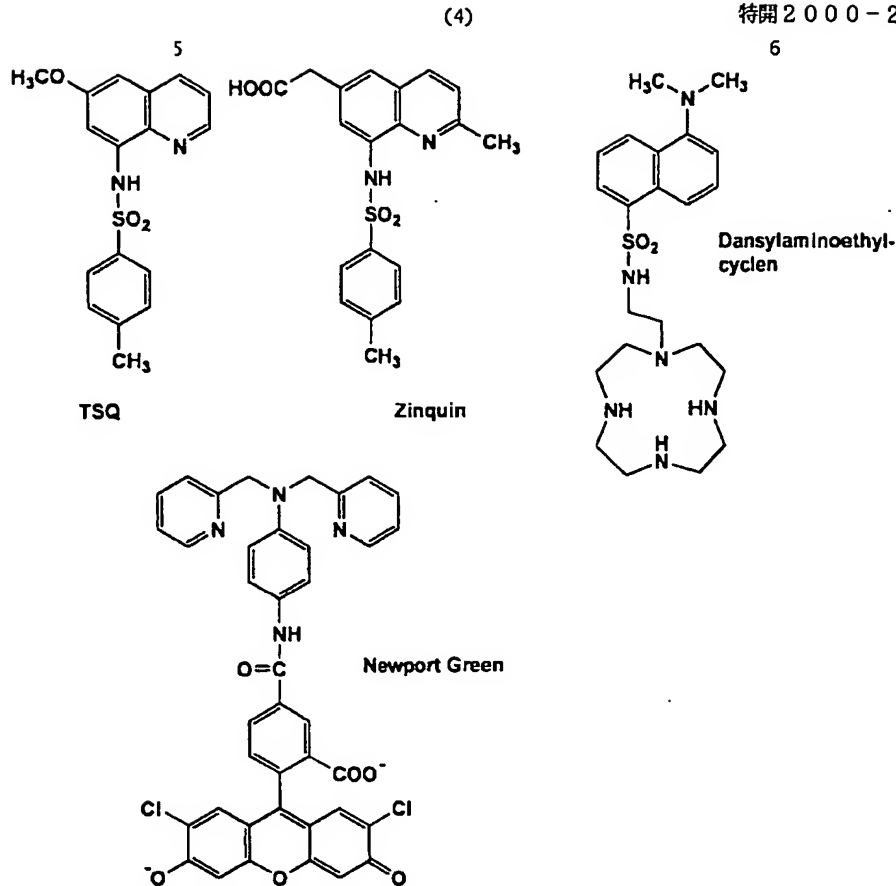
【0004】

【化4】

10

20

30



【0005】しかしながら、TSQ、Zinquin、又はDansylaminoethylcyclenを用いた測定では、短波長領域の励起光を用いる必要があるために（それぞれ、励起波長が367nm、368nm、及び323nmである。）、これらの亜鉛蛍光プローブを生体系の測定に用いた場合には、短波長による励起が細胞傷害を引き起こす可能性があり（細胞工学、17, pp.584-595, 1998）、また、測定の際に細胞系自身が有する自家蛍光（NADHやフラビン類が発する蛍光）による影響を受けやすいという問題がある。さらに、Dansylaminoethylcyclenは測定時に試薬が存在する環境の違い、すなわち溶媒の種類、あるいは細胞外、細胞内もしくは細胞膜などにおける水溶性、脂溶性などの環境の違いにより蛍光強度が大きく変化するという欠点を有しており（蛋白質・核酸・酵素、増刊号、42, pp.171-176, 1997）、TSQは脂溶性が高いために細胞全体に均一に分布させることが困難であるという問題も有している。Newport Greenは長波長の励起光で測定を行なえるものの、亜鉛イオンとのアフィニティーが低く、実用的な測定感度を有していないという問題がある。従って、細胞障害を引き起こすことなく、高感度に亜鉛イオンを測定できる亜鉛蛍光プローブの開発が求められている。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明の課題は、高感

度な亜鉛蛍光プローブとして利用可能な化合物又はその塩を提供することにある。より具体的には、亜鉛イオンを特異的に捕捉することができ、捕捉後の錯体の蛍光強度に優れ、長波長の励起光で蛍光測定を行なうことができる亜鉛蛍光プローブとして利用可能な化合物を提供することが本発明の課題である。また、本発明の別な課題は、上記の特徴を有する化合物を含む亜鉛蛍光プローブ、及び該亜鉛蛍光プローブを用いた亜鉛イオンの測定方法を提供することにある。

【0007】

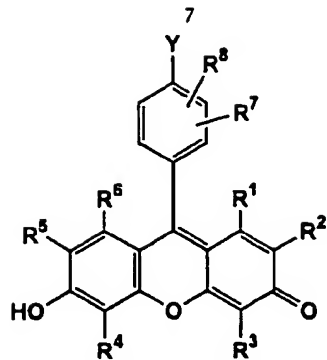
【課題を解決するための手段】本発明者らは上記の課題を解決すべく鋭意研究を行った結果、下記的一般式

(I)又は(II)で表される化合物が亜鉛イオンに対して高い特異性を有しており、亜鉛イオンを捕捉して、長波長領域の励起光で強い蛍光を発する錯体を形成することを見出した。また、この化合物を亜鉛蛍光プローブとして用いると、細胞障害を引き起こすことなく、また、溶媒の種類や組織内外などの試薬が存在する環境の違いによる蛍光強度の変化が小さく、生体内の亜鉛イオンを極めて正確かつ高感度に測定できることを見出した。本発明はこれらの知見を基にして完成されたものである。

【0008】すなわち、本発明は、下記的一般式(I)

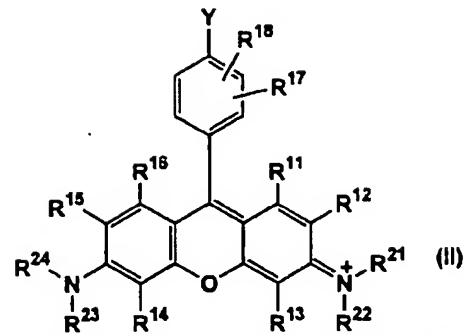
又は(II)：

【化5】



(I)

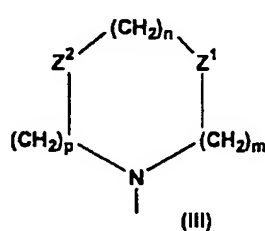
〔式(I)中、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、及び R^6 はそれぞれ独立に水素原子、ハロゲン原子、シアノ基、又は低級アルキル基を示し； R^7 及び R^8 はそれぞれ独立に水素原子、ハロゲン原子、又は低級アルキル基を示し；式(II)中、 R^{11} 、 R^{12} 、 R^{13} 、 R^{14} 、 R^{15} 、及び R^{16} はそれぞれ独立に水素原子、ハロゲン原子、シアノ基、又*



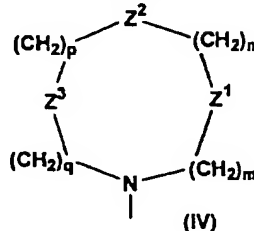
(II)

*は低級アルキル基を示し； R^{17} 及び R^{18} はそれぞれ独立に水素原子、ハロゲン原子、又は低級アルキル基を示し； R^{19} 、 R^{20} 、 R^{21} 、及び R^{22} はそれぞれ独立に水素原子又は低級アルキル基を示し；式(I)及び式(II)中、Yは下記の式(III)ないし(V)：

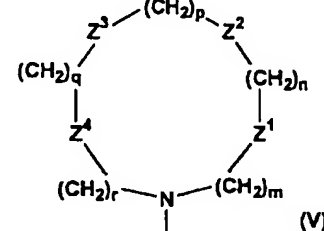
〔化6〕



(III)



(IV)



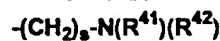
(V)

〔式中、 Z^1 、 Z^2 、 Z^3 、及び Z^4 はそれぞれ独立に $-N(R^{11})-$ 、 $-O-$ 、又は $-S-$ を示すが、 Z^1 、 Z^2 、 Z^3 、及び Z^4 のうちの少なくとも1つは $-N(R^{11})-$ を示し、 R^{11} は水素原子、低級アルキル基、1若しくは2個以上のアミノ基で置換された低級アルキル基（該アミノ基は低級アルキル基、低級アルキルスルホニル基、又はアリールスルホニル基で置換されていてもよい）、※

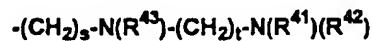
※又は1若しくは2個以上の水酸基で置換された低級アルキル基を示し； m 、 n 、 p 、 q 、及び r はそれぞれ独立に2又は3の整数を示す〕で表される基を示すか、又は式(VI)： $-N(R^{11})(R^{12})$

〔式中、 R^{11} 及び R^{12} はそれぞれ独立に下記の式(VII)ないし(X)：

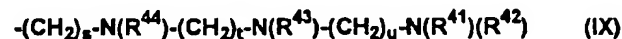
〔化7〕



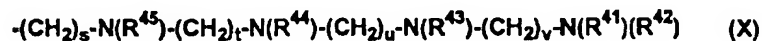
(VII)



(VIII)



(IX)



(X)

〔式中、 R^{11} 、 R^{12} 、 R^{13} 、 R^{14} 、及び R^{15} はそれぞれ独立に水素原子、低級アルキル基、1若しくは2個以上のアミノ基で置換された低級アルキル基（該アミノ基は低級アルキル基、低級アルキルスルホニル基、又はアリールスルホニル基で置換されていてもよい）、又は1若しくは2個以上の水酸基で置換された低級アルキル基を

示し； s 、 t 、 u 、及び v はそれぞれ独立に2又は3の整数を示す〕で表される基及び水素原子からなる群から選ばれる置換基を示すが、 R^{11} 及び R^{12} が同時に水素原子を示すことはない〕で表される基を示す〕で表される化合物又はその塩を提供するものである。

【0009】上記発明の好ましい態様によれば、

(a) R^1 、 R^2 、 R^3 、及び R^4 が水素原子であり、 R^1 及び R^2 がそれぞれ独立に水素原子又はハロゲン原子であり、 R^3 及び R^4 が水素原子であり、 Y が上記式(IV)〔式中、 Z^1 、 Z^2 、及び Z^3 はそれぞれ独立に $-N(R^{11})-$ (R^{11} は低級アルキル基を示す)であり、 m 、 n 、 p 、及び q が2である〕で表される基である式(1)で表される化合物又はその塩；

(b) R^1 、 R^2 、 R^3 、及び R^4 が水素原子であり、 R^1 及び R^2 がともに水素原子であるか、又はともにハロゲン原子であり、 R^3 及び R^4 が水素原子であり、 Y が上記式(IV)〔式中、 Z^1 、 Z^2 、及び Z^3 が共に $-N(CH_3)-$ あり、 m 、 n 、 p 、及び q が2である〕で表される基である上記化合物又はその塩；

(c) R^{11} 、 R^{12} 、 R^{13} 、及び R^{14} が水素原子であり、 R^{11} 及び R^{12} がそれぞれ独立に水素原子又はハロゲン原子であり、 R^{13} 及び R^{14} が水素原子であり、 R^{11} 、 R^{12} 、 R^{13} 、及び R^{14} が水素原子であり、 Y が上記式(IV)〔式中、 Z^1 、 Z^2 、及び Z^3 がそれぞれ独立に $-N(R^{11})-$ (R^{11} は低級アルキル基を示す)であり、 m 、 n 、 p 、及び q が2である〕で表される基である式(1)で表される化合物又はその塩；及び

(d) R^{11} 、 R^{12} 、 R^{13} 、及び R^{14} が水素原子であり、 R^{11} 及び R^{12} がともに水素原子であるか、又はともにハロゲン原子であり、 Y が上記式(IV)〔式中、 Z^1 、 Z^2 、及び Z^3 が共に $-N(CH_3)-$ であり、 m 、 n 、 p 、及び q が2である〕で表される基である上記化合物又はその塩が提供される。

〔0010〕別の観点からは、本発明により、上記式(1)若しくは式(II)で表される化合物又はそれらの塩を含む亜鉛蛍光プローブ；及び上記式(1)若しくは式(II)で表される化合物又はそれらの塩と亜鉛イオンとから形成される亜鉛錯体が提供される。この亜鉛蛍光プローブは、組織や細胞内の亜鉛イオンを測定するために用いることができる。さらに別の観点からは、本発明により、亜鉛イオンの測定方法であって、上記式(1)若しくは式(II)で表される化合物又はそれらの塩を亜鉛蛍光プローブとして用いる方法；亜鉛イオンの測定方法であって、下記の工程：(a)上記式(1)若しくは式(II)で表される化合物又はそれらの塩と亜鉛イオンとを反応させる工程、及び(b)上記工程で生成した亜鉛錯体の蛍光強度を測定する工程を含む方法；並びに、上記式(1)若しくは式(II)で表される化合物又はそれらの塩の亜鉛蛍光プローブとしての使用が提供される。

〔0011〕

〔発明の実施の形態〕本明細書において「低級アルキル基」という場合には、例えば、炭素数1～6個、好ましくは炭素数1～4個の直鎖、分枝鎖、環状、又はそれらの組み合わせからなるアルキル基を意味している。より具体的には、低級アルキル基として、メチル基、エチル基、*n*-プロピル基、イソプロピル基、シクロプロピル

基、*n*-ブチル基、*sec*-ブチル基、イソブチル基、*tert*-ブチル基、シクロプロピルメチル基、*n*-ペンチル基、*n*-ヘキシル基などを用いることができる。また、本明細書においてハロゲン原子という場合には、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、又はヨウ素原子のいずれであってもよい。

〔0012〕式(1)の化合物において、 R^1 、 R^2 、 R^3 、及び R^4 が水素原子であり、 R^1 及び R^2 が水素原子であり、 R^3 及び R^4 がそれぞれ独立に水素原子又はハロゲン原子であることが好ましいが、 R^3 及び R^4 がともに水素原子であるか、又は R^3 及び R^4 がともにハロゲン原子であることがより好ましい。

〔0013〕式(II)の化合物において、 R^{11} 、 R^{12} 、 R^{13} 、及び R^{14} が水素原子であり、 R^{11} 及び R^{12} が水素原子であり、 R^{13} 、 R^{14} 、及び R^{15} が水素原子であり、 R^{11} 及び R^{12} がそれぞれ独立に水素原子又はハロゲン原子であることが好ましいが、 R^{13} 及び R^{14} がともに水素原子であるか、又は R^{13} 及び R^{14} がともにハロゲン原子であることがより好ましい。

〔0014〕 Y が示す基としては、上記の式(III)ないし(V)のいずれかの式で表される環状のクラウン残基のほか、式(VI)で表される基を用いることができる。 Z^1 、 Z^2 、 Z^3 、及び Z^4 はそれぞれ独立に $-N(R^{11})-$ 、 $-O-$ 、又は $-S-$ を示すが、 R^{11} は水素原子、低級アルキル基、1若しくは2個以上のアミノ基で置換された低級アルキル基(該アミノ基は低級アルキル基、低級アルキルスルホニル基、又はアリールスルホニル基で置換されていてもよい)、又は1若しくは2個以上の水酸基で置換された低級アルキル基を示す。 Z^1 、 Z^2 、 Z^3 、及び Z^4 のうちの少なくとも1つは $-N(R^{11})-$ を示す。 Z^1 、 Z^2 、 Z^3 、及び Z^4 のうちの2以上が $-N(R^{11})-$ である場合には、 R^{11} は同一でも異なってもよい。これらのうち、 Z^1 、 Z^2 、 Z^3 、及び Z^4 が独立に $-N(R^{11})-$ (R^{11} がアルキル基である)である場合が好ましい。 R^{15} は低級アルキル基であることが好ましく、該アルキル基は同一でも異なってもよく、メチル基であることがさらに好ましい。

〔0015〕 R^{11} が示すアミノ基で置換された低級アルキル基は、上記に説明した低級アルキル基の任意の位置に1個又は2個以上のアミノ基を有していてもよいが、アルキル基の末端に1個のアミノ基を有しているほうが好ましい。該アミノ基は、1個の低級アルキル基、又は同一若しくは異なる2個のアルキル基で置換されていてもよい。また、低級アルキルスルホニル基又はアリールスルホニル基で置換されていてもよい。アリールスルホニル基としては、置換又は無置換のベンゼンスルホニル基、置換又は無置換のナフタレンスルホニル基などを挙げることができる。アリール基上の置換基の個数、種類、及び置換位置は特に限定されないが、置換基としては、例えば、低級アルキル基、ハロゲン原子、 $C_1 \sim C_6$ 、

のアルコキシル基、水酸基などを挙げることができる。窒素原子上に存在することがある水酸基で置換された低級アルキル基は、炭素数が2個以上の低級アルキル基の任意の位置に1個又は2個以上の水酸基を有していてもよいが、アルキル基の末端に1個の水酸基を有していることが好ましい。

【0016】 R^{11} 、 R^{12} 、 R^{13} 、 R^{14} 、及び R^{15} が示すアミノ基で置換された低級アルキル基、又は水酸基で置換された低級アルキル基は上記に説明したものをを用いることができる。Yとしては、上記の式(IV)で表される基

であることが好ましく、 Z^1 、 Z^2 、及び Z^3 が共に-N(CH₃)₂であることがさらに好ましい。

【0017】式(I)又は式(II)で表される本発明の化合物は酸付加塩又は塩基付加塩として存在することができる。酸付加塩としては、例えば、塩酸塩、硫酸塩、硝酸塩などの鉱酸塩、又はメタンスルホン酸塩、p-トルエンスルホン酸塩、シュウ酸塩、クエン酸塩、酒石酸塩などの有機酸塩などを挙げることができ、塩基付加塩としては、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩などの金属塩、アンモニウム塩、又はトリエチルアミン塩などの有機アミン塩などを挙げることができる。これらのほか、グリシンなどのアミノ酸との塩を形成する場合もある。本発明の化合物又はその塩は水和物又は溶媒和物として存在する場合もあるが、これらの物質はいずれも本発明の範囲に包含される。

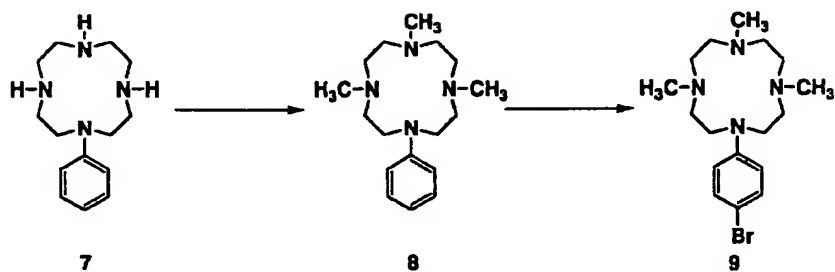
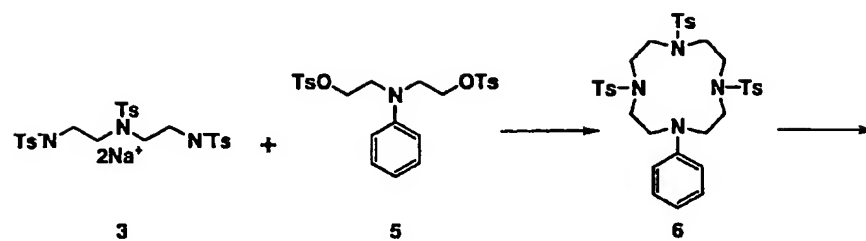
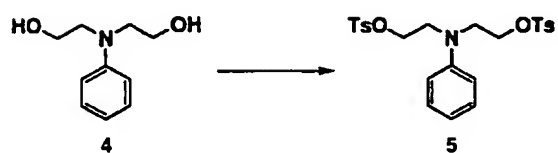
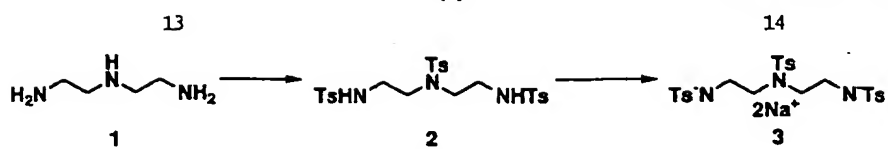
【0018】式(I)又は式(II)で表される本発明の

化合物は、置換基の種類により、1個又は2個以上の不斉炭素を有する場合があるが、1個又は2個以上の不斉炭素に基づく光学活性体や2個以上の不斉炭素に基づくジアステレオ異性体などの立体異性体のほか、立体異性体の任意の混合物、ラセミ体などは、いずれも本発明の範囲に包含される。また、互変異性体が存在する場合があるが、互変異性体がいずれも本発明の範囲に包含されることはいうまでもない。

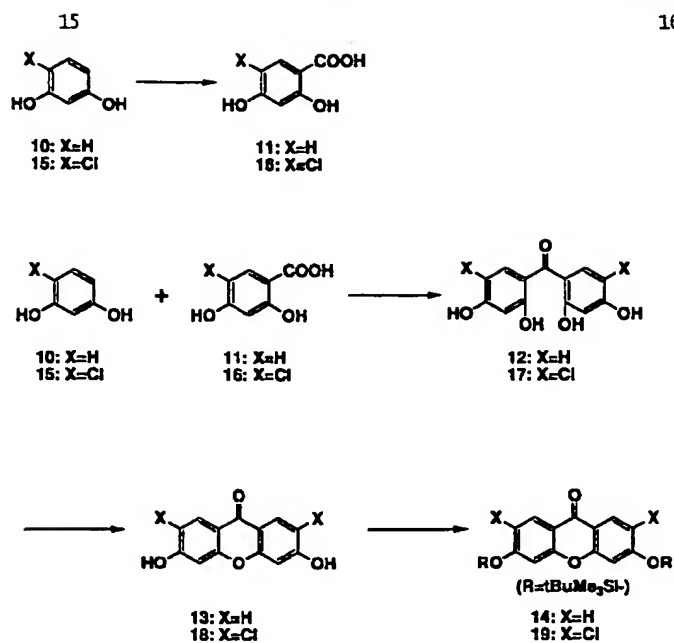
【0019】本発明の化合物の代表的化合物の製造方法を、下記のスキームに示す。また、本明細書の実施例には、このスキームに記載した製造方法がより詳細かつ具体的に示されている。従って、当業者は、これらの説明を基にして反応原料、反応条件、及び反応試薬などを適宜選択し、必要に応じてこれらの方法に修飾や改変を加えることによって、式(I)又は式(II)で表される本発明の化合物をいずれも製造することができる。なお、下記のスキーム中に記載された化合物2及び3はOrg. Synth., 58, 86, 1979に記載されており、化合物11, 12, 及び13はJ. Chem. Soc. (Lond.), 3982, 1955に記載されている。また、化合物16, 17, 及び18はProc. Indian Acad. Sci. Sect. A, 57, 280, 1963に記載されており、化合物14及び19はJ. Biol. Chem., 264, 8171, 1989に記載されており、化合物22はBer. Dtsch. Chem. Ges., 46, 1931-1943, 1913に記載されている。

【0020】

【化8】

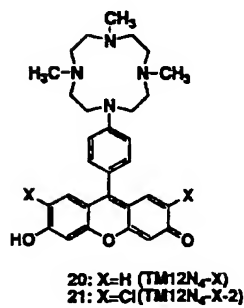
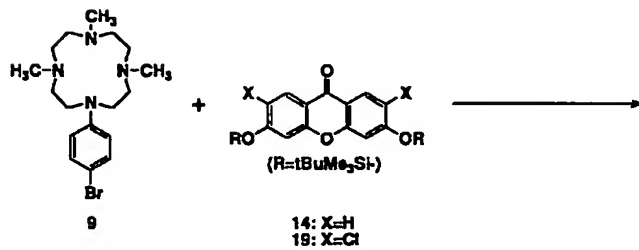


(9)



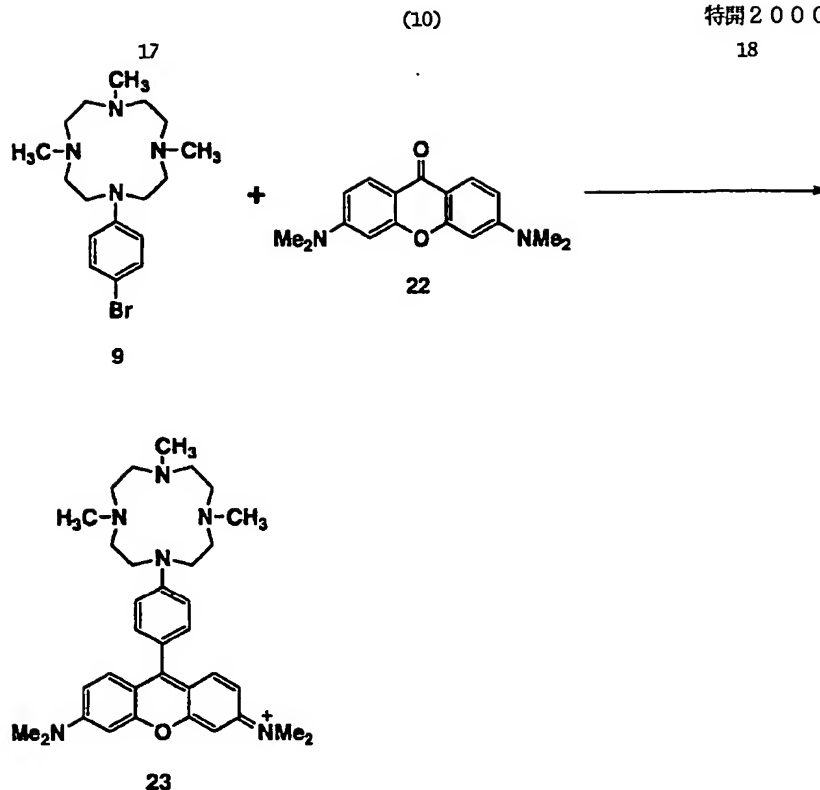
[0022]

20 [化10]



[0023]

[化11]



【0024】式(I)又は式(II)で表される本発明の化合物又はそれらの塩は、亜鉛蛍光プローブとして有用である。本発明の化合物は、それ自体は強い蛍光を発する性質を有していないが、亜鉛イオンを捕捉して亜鉛錯体を形成すると、強い蛍光を発するようになる。本発明の化合物は亜鉛イオンを特異的に捕捉することができ、生体組織や細胞に障害を生じない長波長領域の励起光によって強い蛍光を発するので、生細胞や生組織中の亜鉛イオンを生理条件下で測定するための亜鉛蛍光プローブとして極めて有用である。なお、本明細書において用いられる「測定」という用語については、定量及び定性を含めて最も広義に解釈すべきものである。

【0025】本発明の亜鉛蛍光プローブの使用法は特に限定されず、従来公知の亜鉛プローブと同様に用いることが可能である。通常は、生理食塩水や緩衝液などの水性媒体、又はエタノール、アセトン、エチレングリコール、ジメチルスルホキシド、ジメチルホルムアミドなどの水混合性の有機溶媒と水性媒体との混合物などに式(I)及び式(II)で表される化合物並びにそれらの塩からなる群から選ばれた一物質を溶解し、細胞や組織を含む適切な緩衝液中にこの溶液を添加して、蛍光スペクトルを測定すればよい。例えば、上記スキーム中の化合物20及び21は、それぞれ励起波長が495nm及び505nm、蛍光波長が515nm及び525nmであり、1~10 μ M程度の濃度で用いた場合に10 μ M以下の濃度の亜鉛イオンを測定することが可能である。なお、本発明の亜鉛蛍光プローブを適切な添加物と組み合わせて組成物の形態で用いて

もよい。例えば、緩衝剤、溶解補助剤、pH調節剤などの添加物と組み合わせることができる。

【0026】

【実施例】以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明の範囲は下記の実施例に限定されることはない。実施例中の化合物番号は、上記のスキーム中の化合物番号に対応している。

例1：本発明の化合物の製造

N-フェニルジエタノールアミン(4) 15.3 g (84.4 mmol)を100 mlのピリジンに溶解した溶液に、70 mlのピリジンに溶解したp-トルエンスルホニルクロリド 33.9g (178 mmol)を、氷冷下で30分間かけて滴下した。滴下後、氷冷下で2時間攪拌し、その後、反応液に200 mlの水を加え、終夜攪拌した。析出した固体を濾取して塩化メチレンに溶解し、この溶液を水、飽和食塩水で洗浄後、硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧留去し、化合物(5) 37.5 gを得た。淡黄色固体。収率90.8%。

$^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CDCl_3) : δ 2.42 (s, 6H), 3.56 (t, 4H, J=6.0Hz), 4.10 (t, 4H, J=6.0Hz), 6.49 (d, 2H, J=8.1Hz), 6.74 (t, 1H, J=7.3Hz), 7.15 (m, 2H), 7.27 (d, 4H, J=8.2Hz), 7.70 (d, 4H, J=8.2Hz) MS(FAB): 490(M+1)

m.p.: 89°C (ジエチルエーテル)

【0027】化合物(3) 41.3 g (67.8 mmol)を 300 mlの無水ジメチルホルムアミドに溶解した溶液を、アルゴン下で100°Cまで加熱し、120 mlの無水ジメチルホルムアミドに溶解した化合物(5) 36.5 g (74.6 mmol)を1.5

時間かけて滴下した。滴下後、100°Cで1時間攪拌し、反応液を室温まで冷却した後、500 mlの水を加え、氷冷下に4時間攪拌した。析出した固体を濾取して塩化メチレンに溶解し、この溶液を、水、飽和食塩水で洗浄後、硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧留去し、粗化合物(6)を得た。シリカゲルカラムにより精製し、化合物(6) 29.9gを得た。白色固体。収率 62.1%。

¹H-NMR (300MHz, CDCl₃): δ 2.44 (s, 9H), 3.22 (m, 4H), 3.31 (m, 4H), 3.39 (t, 4H, J=5.0Hz), 3.75 (t, 4H, J=5.0Hz), 6.79-6.74 (m, 3H), 7.23 (m, 1H), 7.32 (d, 2H, J=8.4Hz), 7.33 (d, 4H, J=8.1Hz), 7.68 (d, 4H, J=8.1Hz), 7.69 (d, 2H, J=8.4Hz)

MS(FAB): 711(M⁺+1)

Anal. Calcd for C₃₁H₄₂N₄O₆S₂: C, 59.13; H, 5.95; N, 7.88. Found: C, 58.57; H, 5.84; N, 7.88.

m.p. 178°C (メタノール)

【0028】細かく砕いた化合物(6) 28.3 g (39.8 mmol)を無水n-ブタノール900 mlに加え、続いてナトリウム 40 g (1.74 mol)を加え、ナトリウム片が消えるまで還流した。室温まで冷却後、更に 40 g (1.74 mol)のナトリウムを加え、再びナトリウム片が消えるまで還流した。室温まで冷却後、氷冷下1リットルの水を少しずつ加えた。n-ブタノール層を、0.5N水酸化ナトリウムで洗浄した後に、2N塩酸で抽出した。2N塩酸層をジエチルエーテルで洗浄した後に、水酸化ナトリウムを加えてアルカリ性にして、塩化メチレンで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、炭酸カリウムで乾燥した。溶媒を減圧留去し、化合物(7) 6.60gを得た。褐色オイル。収率66.8%。

¹H-NMR (300MHz, CDCl₃): δ 2.63 (t, 4H, J=4.8Hz), 2.77-2.84 (m, 8H), 3.38 (t, 4H, J=5.0Hz), 6.82 (t, 1H, J=7.3Hz), 6.98 (d, 2H, J=8.1Hz), 7.23 (m, 2H)

MS(FAB): 249(M⁺+1)

【0029】化合物(7) 5.00 g (20.2 mmol)をメタノール 300 mlに溶かし、37%ホルムアルデヒド溶液 50 mlを加え、続いてシアノ水素化ほう素ナトリウム 13.4 g (213 mmol)を少しずつ加えた。室温で2時間攪拌した後、酢酸を加えて溶液のpHを中性にして、さらに室温で3時間攪拌した。メタノールを減圧留去して、残渣を2N水酸化ナトリウム水溶液に懸濁し、塩化メチレンで抽出した。塩化メチレン層を0.5N水酸化ナトリウムで洗浄した後、2N塩酸で抽出した。2N塩酸層に水酸化ナトリウムを加えてアルカリ性にし、塩化メチレンで抽出した。塩化メチレン層を飽和食塩水で洗浄後、炭酸カリウムで乾燥した。塩化メチレンを減圧下留去し、粗化合物(8)を得た。アルミナカラムにより精製し、化合物(8) 1.53gを得た。褐色オイル。収率26.1%。

¹H-NMR (300MHz, CDCl₃): δ 2.25 (s, 3H), 2.31 (s, 6H), 2.53 (m, 8H), 2.80 (t, 4H, J=5.9Hz), 3.51 (t, 4H, J=5.9Hz), 6.63 (m, 3H), 7.19 (dd, 2H, J=7.2, 8.

8Hz)

MS(EI): 290(M⁺)

【0030】化合物(8) 501 mg (1.73 mmol)をジオキサン 20 mlと水 10 mlに溶解した溶液に、5N水酸化カリウム水溶液を0.38 ml加えた。氷冷下、臭素 105 ml (2.04 mmol)をジオキサン 8 mlに溶解した溶液を2時間かけて滴下し、滴下後、反応液を氷冷下で1時間攪拌した。溶媒を減圧留去し、残渣を塩化メチレンに懸濁した。塩化メチレン層を0.5N水酸化ナトリウムで洗浄した後、2N塩酸で抽出した。2N塩酸層をジエチルエーテルで洗浄した後、水酸化ナトリウムを加えてアルカリ性にし、塩化メチレンで抽出した。塩化メチレン層を飽和食塩水で洗浄した後、炭酸カリウムで乾燥した。塩化メチレンを減圧留去し、化合物(9) 572mgを得た。褐色オイル。収率89.6%。

¹H-NMR (300MHz, CDCl₃): δ 2.17-2.23 (m, 8H), 2.43 (s, 3H), 2.44 (s, 6H), 2.69 (t, 4H, J=6.0Hz), 3.39 (t, 4H, J=6.0Hz), 6.44 (d, 2H, J=9.2Hz), 7.17 (d, 2H, J=9.2Hz)

MS(EI⁺): 368, 370 (1:1)(M⁺)

【0031】化合物(9) 299 mg (0.81 mmol)を無水2-メチルテトラヒドロフラン 20 mlに加え、アルゴン下液体窒素-イソペンタン浴中で-150°Cまで冷やし、1.64N tert-ブチルリチウムn-ペンタン溶液2.85 mlを加えた。TLCで原料の消失を確認した後、化合物(14) 719 mg (1.58 mmol)を25 mlのテトラヒドロフランに溶解した溶液を少しずつ加えた。-150°Cで1時間攪拌した後、反応液を室温まで戻した。反応液に水20 mlとテトラヒドロフラン10 mlの混合液を加えた後に、溶媒を減圧留去した。

残渣に2N塩酸 10 mlを加え、遮光して室温で1時間攪拌した。塩酸溶液をジエチルエーテルで洗浄した後、水酸化ナトリウムを加えてアルカリ性にし、再び水層をジエチルエーテルで洗浄した。2N塩酸、2N水酸化ナトリウムを用いてpHを7~8に調節し、析出してきた固体を濾取して粗化合物(20)を得た。オクタデシルカラムにより精製し、化合物(20) 90.7 mgを得た。茶色固体。収率22.4%。

¹H-NMR (300MHz, DMSO-d₆+D₂O): δ 2.16 (s, 3H), 2.61 (m, 10H), 2.85 (m, 4H), 2.99 (m, 4H), 3.72 (m, 4H), 6.28 (d, 2H, J=2.0Hz), 6.37 (dd, 2H, J=2.0, 9.3 Hz), 6.87 (d, 2H, J=8.8Hz), 7.04 (d, 2H, J=9.3Hz), 7.27 (d, 2H, J=8.6Hz)

MS(FAB): 501(M⁺+1)

m.p.: 189°C

【0032】化合物(9) 300 mg (0.81 mmol)を無水2-メチルテトラヒドロフラン 30 mlに加え、アルゴン下液体窒素-イソペンタン浴中で-150°Cまで冷やし、1.54N tert-ブチルリチウムn-ペンタン溶液 2.50 mlを加えた。TLCで原料の消失を確認した後、化合物(19) 500 mg (0.95 mmol)を10 mlのテトラヒドロフランに溶解した溶液を

少しずつ加えた。-150°Cで1時間攪拌後、反応液を室温まで戻した。反応液に水20 mlとテトラヒドロフラン 10 mlの混合液を加えた後に、溶媒を減圧留去した。残渣に2N塩酸 10 mlを加え、遮光して室温下1時間攪拌した。塩酸溶液をジエチルエーテルで洗浄した後、水酸化ナトリウムを加えてアルカリ性にし、塩化メチレン-メタノール (5:1) で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄後、硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を減圧留去し、粗化合物(21)を得た。オクタデシルカラムにより精製し、化合物(21)を得た。褐色固体。収率1.2%。

$^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CD_3OD): δ 2.26 (s, 3H), 2.66-2.69 (m, 4H), 2.68 (s, 6H), 2.89-2.93 (m, 4H), 3.09 (m, 4H), 3.79 (m, 4H), 6.54 (s, 2H), 6.96 (d, 2H, J=8.8Hz), 7.29 (s, 2H), 7.31 (d, 2H, J=8.8Hz)

MS(FAB) 569, 571, 573 ($M+1$)

m.p.: 230°C

【0033】例2：亜鉛イオンに対する選択性

上記例1で得た化合物20及び化合物21を用いて、亜鉛イオンに対する選択性を評価した。種々の金属イオン (5 μM 又は5 mM) を含む100 mM HEPES (pH 7.5)中に5 μM の化合物20又は21を加え、蛍光強度を測定した。化合物20については励起波長 495 nm、蛍光波長 515 nmとし、化合物21については励起波長 505 nm、蛍光波長 525 nmとして蛍光スペクトルを測定した。結果を図1及び図2に示す。図中、縦軸の蛍光強度は、金属イオンを加えていないときの蛍光強度を1として、各金属イオンを加えたときの蛍光強度を数値で示したものである。これらの結果から、本発明の化合物が亜鉛イオンに対して極めて高い選択性を有しており、生体内に多量に存在するナトリウムイオン、カリウムイオン、カルシウムイオンなどの存在下では、全く蛍光強度が増加しないことが明らかである。

【0034】例3：亜鉛蛍光プローブの検出感度

亜鉛蛍光プローブとして使われているNewport Green (Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, 6th Edition by Richard P. Haugland, pp.531-540)と本発明の亜鉛蛍光プローブの測定感度を比較した。種々の濃度の亜鉛イオン (10 μM まで) を含む100 mM HEPES (pH 7.5)中に5 μM の化合物20、化合物21、又はNewpor

t Greenを加え、蛍光強度を測定した。化合物20については励起波長 495 nm、蛍光波長 515 nmとし、化合物21については励起波長 505 nm、蛍光波長 525 nmとし、Newport Greenについては励起波長 505 nm、蛍光波長 530 nmとして蛍光スペクトルを測定した。結果を図3に示す。図中、縦軸の蛍光強度は、金属イオンを加えていないときの蛍光強度を1として、各金属イオンを加えたときの蛍光強度を数値で示したものである。この結果から明らかなように、本発明の化合物は、従来亜鉛蛍光プローブとして用いられているNewport Greenに比べて、はるかに高い検出感度を有している。

【0035】例4：亜鉛蛍光プローブの蛍光強度

化合物20及び21について、亜鉛イオン濃度と蛍光強度との相関関係を調べた。種々の濃度の亜鉛イオン (10 μM まで) を含む100 mM CAPS (pH 10.0)中に5 μM の化合物20又は化合物21を加え、蛍光強度を測定した。化合物20については励起波長 495 nm、蛍光波長 515 nmとし、化合物21については励起波長 505 nm、蛍光波長 525 nmとして蛍光スペクトルを測定した。結果を図4及び図5に示す。両化合物とも亜鉛イオンの濃度に依存して蛍光強度が上昇し、化合物に対して1当量以上の亜鉛イオンの存在下では、蛍光強度が一定になることが認められた。この結果は、本発明の化合物が亜鉛と1:1の錯体を形成していることを示している。

【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明の亜鉛蛍光プローブ (化合物20) が亜鉛イオンに対して優れた選択性を有していることを示した図である。

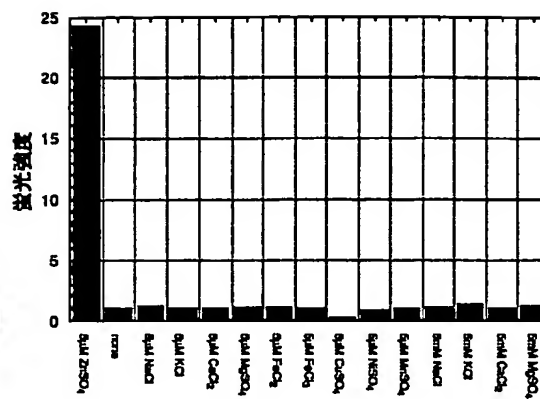
【図2】 本発明の亜鉛蛍光プローブ (化合物21) が亜鉛イオンに対して優れた選択性を有していることを示した図である。

【図3】 本発明の亜鉛蛍光プローブ (化合物20及び21) の蛍光強度を従来公知の亜鉛蛍光プローブ (Newport Green) と比較した結果を示す図である。

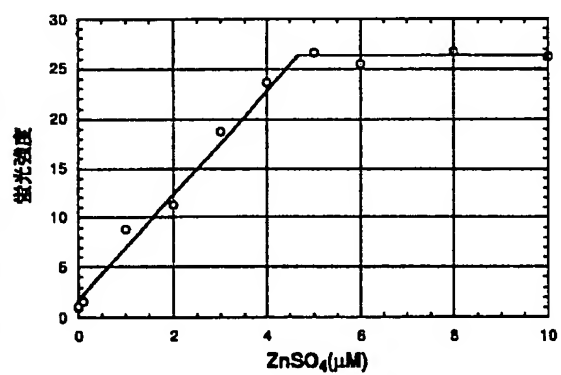
【図4】 本発明の亜鉛蛍光プローブ (化合物20) の蛍光強度と亜鉛イオン濃度との関係を示した図である。

【図5】 本発明の亜鉛蛍光プローブ (化合物21) の蛍光強度と亜鉛イオン濃度との関係を示した図である。

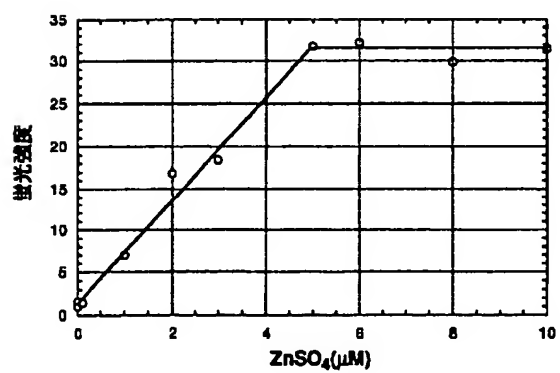
【圖2】



【圖4】



【圖5】



フロントページの続き

F ターム(参考) 2G042 AA01 BC11 CA10 CB10 DA06
DA08 FA06 FA11
2G045 AA24 AA25 BB25 BB60 CB01
DB12 FA11 FB07 FB12 GC15
2G054 AA08 AB07 CA10 EA03 EA06
GA04 GB04 GB05
4C063 AA01 BB06 CC59 CC67 CC79
DD47 DD79 EE10
4H048 AA01 AA03 AB92 VA67 VB10